



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN  
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



**2-0002633**

(51)

(13) **Y**

---

(21) 2-2021-00040

(22) 08/01/2018

(67) 1-2018-00078

(45) 25/05/2021 398

(43) 27/05/2019 374A

(73) **CÔNG TY TNHH FLORIST VIỆT NAM (VN)**

Số 61A, Thủy Nguyên, khu đô thị Ecopark, xã Xuân Quan, huyện Văn Giang, tỉnh Hưng Yên

(72) Lê Văn Vĩnh (VN); Bùi Công Thắng (VN).

---

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG HOA ĐỒNG TIỀN (GERBERA JAMESONII) BẰNG  
PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO**

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật, trong đó quy trình bao gồm các bước: a) tạo chồi mẫu ban đầu; b) nhân nhanh chồi và cụm chồi; c) tạo và chuẩn hóa cây con hoàn chỉnh; và d) ra ngôi cây con ngoài vườn ươm. Theo quy trình của sáng chế này đã tạo ra được nguồn cây mẫu ban đầu từ để hoa đạt tỷ lệ thành công trên 80%. Nhân nhanh chồi và cụm chồi trên môi trường MS (*Murashige and Skoog*) cải tiến có bổ sung chất kích thích sinh trưởng phù hợp đạt hệ số nhân nhanh trung bình 3,5 lần. Tạo và chuẩn hóa cây con hoàn chỉnh đưa cây ra vườn ươm đạt tỷ lệ sống trên 80% sau 30 ngày ươm trồng. Kết quả của quy trình theo sáng chế đã tạo ra được nguồn cây giống sạch bệnh, ổn định về mặt di truyền với số lượng lớn, có tính đồng đều cao và đáp ứng được nhu cầu lớn về cây giống trong nước và hướng tới xuất khẩu.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật và nông nghiệp, cụ thể đề cập đến quy trình nhân giống hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đạt tỷ lệ sống cao. Mục đích của sáng chế là tạo ra nguồn cây giống sạch bệnh, ổn định về mặt di truyền với số lượng lớn và có tính đồng đều cao.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) là loài hoa có giá trị kinh tế cao, được trồng thương mại trên toàn thế giới. Những phương pháp nhân giống hoa đồng tiền phổ biến từ trước đến nay như phương pháp gieo hạt, phương pháp tách bụi bộc lộ nhiều hạn chế về mặt di truyền, số lượng, sự thoái hóa, v.v., vì vậy, việc nhân giống hoa đồng tiền đang đối mặt với các vấn đề đòi hỏi áp dụng các phương pháp công nghệ sinh học hiện đại, trong đó phương pháp nuôi cấy mô được sử dụng với hệ số nhân mỗi năm tăng cao gấp nhiều lần, đây có thể là phương pháp lý tưởng vì đến nay chưa có sự bất thường di truyền nào được công bố.

Các phương pháp nhân giống và tái sinh *in vitro* cây hoa đồng tiền được mô tả trước đây bao gồm sự hình thành rễ bất định và cảm ứng tạo mô sẹo từ lá non (Pierik và Segers, 1972), sự hình thành trực tiếp chồi bất định từ hoa (Pierik và cộng sự, 1973, 1975) và từ chồi đỉnh (Murashige và cộng sự, 1974). Các nghiên cứu sâu hơn về việc nhân giống hoa đồng tiền cũng được công bố, sự cảm ứng tạo mô sẹo từ noãn (Meynet và Sibi, 1984), sự hình thành chồi bất định trực tiếp từ lá (Hedtrich, 1979), sự tái sinh chồi bất định từ mô sẹo cuống lá (Orlikowska và cộng sự, 1999) và phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (tTCL) từ đế hoa (Nhật và các cộng sự, 2007). Ngoài ra, đã có nhiều nghiên cứu và nỗ lực đưa cây giống hoa đồng tiền ra ngoài vườn ươm đạt tỷ lệ sống không cao, do mức độ thích ứng kém của giống hoa đồng tiền với những điều kiện thay đổi khí hậu khó khăn xảy ra. Do đó, cần có một quy trình nhân giống hiệu quả và phương thức đưa cây giống hoa đồng tiền nuôi cấy mô ra ngoài vườn ươm đạt tỷ lệ sống chấp nhận được (trên 70%) nhằm nâng cao hiệu quả của quy trình nhân giống hoa đồng tiền hiện nay.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là nhằm phát triển một phương pháp thực tế, hiệu quả, chi phí hợp lý và dễ làm đối với việc nhân giống hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy mô đạt tỷ lệ sống cao ở các thời điểm điều kiện khí hậu thời tiết khác nhau.

Để đạt được mục đích trên, sáng chế đề xuất quy trình nhân giống hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) Tạo chồi mẫu ban đầu

Những cây Hoa đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp được tuyển chọn làm vật liệu tạo chồi, mẫu để nhân giống là đế của nụ hoa đồng tiền có chiều cao từ 0,5- 2,0cm. Các mẫu được lựa chọn kỹ, loại bỏ các tế bào chết xung quanh và được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó được để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Đưa mẫu vào tủ cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch  $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$  10% trong 7-9 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch  $\text{HgCl}_2$  0,2% trong 2-3 phút, cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng. Các mẫu cấy sau khi khử trùng xong, đế hoa được loại bỏ sạch lớp áo bên ngoài. Mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung TDZ 0,05mg/L, nước dừa 10%, đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0 trong 12 tuần, quang chu kỳ 12 giờ/ngày cường độ ánh sáng 1500 lux, nhiệt độ đạt  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  để thu được chồi cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô.

b) Nhân nhanh chồi và cụm chồi

Các mẫu sau khi bật chồi được chuyển sang cấy trên môi trường MS có bổ sung BA (Benzyladenin) 0,5mg/L, IBA (axit Indole-3-butyric) 0,05mg/L, nước dừa 10% , đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0. Kết quả cho hệ số nhân cao nhất sau 4 tuần nuôi cấy.

c) Tạo và chuẩn hóa cây con hoàn chỉnh

Các cụm chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm được tách nhỏ và cấy vào bình chứa môi trường MS có bổ sung IBA (axit Indole-3-butyric) 0,5mg/L,  $\alpha\text{NAA}$  (axit  $\alpha$  - Naphthalen axetic) 0,05mg/L, đường 30g/L, nước dừa 10%, than hoạt tính 1,0g/L, và thạch 6,5g/L, độ pH 6,2. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau 2 tuần thu được cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng 0,3g/cây và 2-3 rễ.

d) Ra ngôi cây con ngoài vườn ươm

Để cây thu được ở bước c) ra ngoài vườn ươm 5-7 ngày, sau đó tiến hành ra cây, rửa sạch môi trường bám ở cây hoa đồng tiền sau đó khử trùng cây trong dung dịch có chứa hoạt chất Metalaxyl nồng độ 10% trong 3 phút và trồng cây trên vỉ xốp hoặc vỉ nhựa có chứa giá thể xơ dừa (giá thể dành cho việc ươm cây con), cây được đặt trên giàn cao để trong vườn ươm nhiệt độ từ 20 đến  $28^\circ\text{C}$ , độ ẩm không khí đạt 80% trở lên, che phủ ánh sáng tự nhiên từ 80 đến 95%, thời gian trồng khoảng 8 tuần để thu được cây hoa đồng tiền giống.

**Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1 là ảnh chụp mẫu cấy cây hoa đồng tiền dùng để đưa vào nuôi cấy mô

Hình 2 là ảnh chụp các cụm chồi được nhân nhanh.

Hình 3 là ảnh chụp cây hoa đồng tiền hoàn chỉnh *in vitro*.

Hình 4 là ảnh chụp cây hoa đồng tiền được trồng ngoài vườn ươm.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Mẫu cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô dùng trong quy trình theo sáng chế là mẫu được lấy từ đế hoa của những cây hoa đồng tiền được tuyển chọn từ vườn ươm của Công ty Florist Việt Nam.

Môi trường chuẩn MS dùng để nuôi cấy mô là môi trường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Môi trường MS (Murashige and Skoog) là môi trường nuôi cấy mô tiêu chuẩn bao gồm các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng và chất kích thích sinh trưởng đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ví dụ về môi trường nuôi cấy và kỹ thuật nuôi cấy mô chuẩn có thể tìm thấy trong các tài liệu: R.L.M Pierik - 1999, "In Vitro Culture of Higher Plants" và Trần Văn Minh, "Nuôi cấy mô tế bào thực vật", (Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 1994).

Metalaxyl là hoạt chất trừ nấm thuộc nhóm Alanin, đặc biệt hiệu quả với nhóm nấm Oomycetes mà hai đại diện điển hình của nó là *Phytophthora* và *Pythium* gây nên các bệnh nghiêm trọng trên cây trồng. Hoạt chất metalaxyl có tác dụng nội hấp và lưu dẫn mạnh, thuốc được hấp thu qua lá, thân, rễ cây trồng, sau đó vận chuyển, lưu dẫn trong cây, ức chế tổng hợp protein, can thiệp vào quá trình tổng hợp ARN Ribosome của tế bào nấm. Phòng trừ hiệu quả các loại nấm phát sinh từ đất và các loại nấm phát tán bào tử trong không khí.

Quy trình theo sáng chế tập trung nghiên cứu và giải quyết được những bước khó khăn trong quy trình nhân giống cây hoa đồng tiền. Cụ thể là:

- Bước tạo mẫu cây ban đầu: Trước hết là cách lựa chọn mẫu cây, cách khử trùng mẫu cây và môi trường nuôi cấy ban đầu tối ưu, cho tỷ lệ mẫu cây sống cao (trên 80%), tỷ lệ tạo chồi đạt 4-6 chồi/mẫu, thời gian tạo chồi nhanh (12 tuần).
- Chuẩn hóa cây con và tạo môi trường ra cây hoàn chỉnh: Do đặc điểm khó thích nghi của cây giống hoa đồng tiền và do điều kiện khí hậu khó khăn khi đưa cây con ra ngoài tự nhiên, vì vậy trước khi đưa ra vườn ươm cây giống hoa đồng tiền cần được chuẩn hóa theo tiêu chuẩn: Cây Hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng khoảng 0,3g/cây và có từ 2-3 rễ/cây.
- Giá thể ra cây: Giá thể xơ dừa ươm cây con, độ ẩm giá thể từ 60-70%.
- Tạo môi trường ra cây tối ưu: Nhà kính đạt tiêu chuẩn tối ưu, chủ động điều chỉnh được nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng thích hợp với từng giai đoạn phát triển của cây.

Sáng chế đề xuất đến quy trình nhân giống hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, bao gồm các bước:

a) Tạo chồi mẫu ban đầu:

Chuẩn bị môi trường: Sử dụng môi trường MS có bổ sung TDZ 0,05mg/L, nước dừa 10%, đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút, sau đó môi trường được đưa vào tủ cấy và được rót chia đều vào các bịch nilon đã được hấp khử

trùng, mỗi bịch chứa 80ml dung dịch môi trường. Môi trường sau đó được bảo quản tối, chỗ thoáng mát khoảng 5-7 ngày thì lấy ra sử dụng cho việc vào mẫu.

Chuẩn bị mẫu cây: Những nụ hoa có chiều cao từ 0,5-2cm của các cây hoa đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp được tuyển chọn từ 1000 cây hoa đồng tiền bố mẹ trồng tại vườn ươm của Công ty Florist Việt Nam.

Khử trùng mẫu cây: Các nụ hoa đạt tiêu chuẩn sẽ được đem vào phòng nuôi cấy để khử trùng, mẫu được rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy 10 phút, sau đó được để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ. Đưa mẫu vào tủ cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch  $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$  10% trong 7-9 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch  $\text{HgCl}_2$  0,2% trong 2-3 phút, cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng.

Mẫu cây sau khi khử trùng xong, tiến hành thao tác loại bỏ lớp áo bên ngoài và các lớp tế bào chết xung quanh nụ bằng các dụng cụ chuyên dụng, sau đó mẫu được cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn ở trên. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  để thu được chồi của cây hoa đồng tiền trong 12 tuần nuôi cấy.

Quy trình theo sáng chế đã đưa mẫu cây vào thành công, đặc biệt cách lựa chọn mẫu cây, cách khử trùng mẫu cây và môi trường nuôi cấy ban đầu tối ưu, cho tỷ lệ mẫu cây sống cao (trên 80%), tỷ lệ tạo chồi đạt 4-6 chồi/mẫu, thời gian tạo chồi nhanh (khoảng 12 tuần).

b) Nhân nhanh chồi và cụm chồi:

Chuẩn bị môi trường: Sử dụng môi trường MS có bổ sung BA (Benzyladenin) 0,5mg/L, IBA (axit Indole-3-butyric) 0,05mg/L, nước dừa 10%, đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0, được hấp tiệt trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 30 phút, sau đó môi trường được đưa vào tủ cấy và được rót chia đều vào các bịch nilon đã được hấp khử trùng, mỗi bịch chứa 80ml dung dịch môi trường, môi trường sau đó được bảo quản tối, chỗ thoáng mát khoảng 3-5 ngày thì lấy ra sử dụng cho nhân nhanh chồi và cụm chồi.

Nhân nhanh chồi và cụm chồi: Các cụm chồi thu được ở giai đoạn 1 được đưa vào để nhân nhanh, các cụm chồi được cắt bỏ phần lá, giữ lại phần gốc có độ dài khoảng 1cm, các cụm chồi được tách nhỏ sao cho mỗi cụm chứa khoảng 3-5 chồi rồi tiến hành cấy vào môi trường đã chuẩn bị ở trên. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  để thu được các cụm chồi của cây hoa đồng tiền trong 4 tuần nuôi cấy. Quá trình được lặp lại đến khi đạt được số lượng mong muốn để tiến hành giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh.

Quy trình theo sáng chế đã thu được kết quả nhân chồi cao với hệ số nhân chồi đạt trung bình là 3,5 lần trong thời gian 4 tuần nuôi cấy.

c) Tạo và chuẩn hóa cây con hoàn chỉnh:

Chuẩn bị môi trường: Sử dụng môi trường MS có bổ sung IBA (axit Indole-3-butyric) 0,5mg/L,  $\alpha$ NAA (axit  $\alpha$  - Naphthalen axetic) 0,05mg/L, đường 30g/L, nước dừa 10%, than hoạt tính 1,0g/L, và thạch 6,5g/L, độ pH 6,2, được hấp tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút, sau đó môi trường được đưa vào tủ cấy và được rót chia đều vào các bịch nilon đã được hấp khử trùng, mỗi bịch chứa 80ml dung dịch môi trường. Môi trường sau đó được bảo quản tối, chỗ thoáng mát khoảng 3-5 ngày thì lấy ra sử dụng cho việc tạo cây hoàn chỉnh.

Tạo cây con hoàn chỉnh: Các chồi có kích thước 2-3cm được tách nhỏ, giữ nguyên lá và cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn trước đó. Các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau 2 tuần thu được cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao cây khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng 0,3g/cây và có từ 2-3 rễ/cây, màu sắc cây hoa đồng tiền xanh đậm thì tiến hành đưa cây ra ngoài vườn ươm.

d) ra ngôi cây con ngoài vườn ươm:

Việc đưa cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô ra môi trường vườn ươm là bước nhằm cho cây hoa đồng tiền con thích nghi với điều kiện ngoại cảnh, hạn chế cây bị sốc khi đưa từ môi trường tối ưu, đầy đủ chất dinh dưỡng ra môi trường tự dưỡng, cây phải tự tổng hợp chất dinh dưỡng ngoài tự nhiên và sinh trưởng. Các cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô đã được chuẩn hóa, đủ tiêu chuẩn đưa ra trồng được ngoài vườn ươm có nhiệt độ trong khoảng từ 20 đến 28°C, trong thời gian khoảng từ 7-10 ngày. Các bịch nuôi cấy được để trong nhà kính tránh nước mưa gây nhiễm khuẩn cho cây.

Cây hoa đồng tiền con sau khi đã được thích nghi với môi trường được đưa ra khỏi bịch nuôi cấy và cẩn thận lấy cây ra khỏi bình, dùng nước sạch rửa sạch môi trường bám quanh cây, tránh cây bị dập nát, và tránh không làm đứt rễ cây. Xử lý ngâm cây trong thuốc có chứa hoạt chất metalaxyl 10% trong 3 phút có thể gia tăng tỷ lệ sống khi ra cây đồng thời có tác dụng hiệu quả đối với một số cây đã bị nhiễm nấm khuẩn, hoạt chất metalaxyl có tác dụng phòng trừ hiệu quả các loại nấm phát sinh từ đất và các loại nấm phát tán bào tử trong không khí nên giúp cho cây hoa đồng tiền con tránh được những tổn thương do nấm, vi khuẩn tấn công trong giai đoạn đầu khi cây được đưa ra môi trường tự dưỡng.

Sau khi cây con đã được rửa sạch, đưa cây con ra ươm trồng trên vỉ xốp, vỉ nhựa, v.v., có chứa giá thể xơ dừa. Cây được đặt trên giàn cao cách mặt đất từ 60-80cm để trong nhà kính vườn ươm, với các điều kiện được điều chỉnh tối ưu: Nhiệt độ từ 20 đến 28°C, độ ẩm không khí đạt 80% trở lên, ánh sáng được điều chỉnh tăng dần phù hợp với từng giai đoạn độ tuổi của cây. Trong quá trình trồng, loại bỏ những cây bị nấm bệnh để tránh lây nhiễm. Tỷ lệ cây sống sau 8 tuần có thể đạt trên 80%.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Ví dụ 1: Tạo chồi từ mẫu cấy để hoa đồng tiền

Những nụ hoa có chiều cao từ 0,5-2cm của các cây hoa đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp được tuyển chọn từ vườn ươm của Công ty Florist Việt Nam, sau khi được khử trùng và được đưa vào cấy trên những môi trường cảm ứng tạo mô sẹo chứa các tổ hợp các chất kích thích sinh trưởng khác nhau. Các môi trường được sử dụng: (1) MS chứa BAP 3,0mg/l, kinetin 1,0mg/l và  $\alpha$ NAA 0,5mg/l; (2) MS chứa BAP 3,0mg/l, kinetin 1,0mg/l,  $\alpha$ NAA 0,5mg/l và nước dừa 10%; (3) MS chứa TDZ 0,05mg/l và (4) MS chứa TDZ 0,05mg/l và nước dừa 10%.

Kết quả cho thấy, môi trường (3) TDZ có nồng độ 0,05mg/l là tối ưu cho sự hình thành chồi; môi trường (4) TDZ có nồng độ 0,05mg/l kết hợp với 10% nước dừa cho sự tái sinh chồi cao nhất sau 6 tuần nuôi cấy. Trong môi trường này, tỷ lệ sống cao nhất trên 80% trong khi tỷ lệ tái sinh chồi đạt 80% với 4-6 chồi trên một mẫu cấy.

Ví dụ 2: Chuẩn hóa cây giống hoa đồng tiền *in vitro* và tỷ lệ thích nghi khi đưa cây ra ngoài vườn ươm

Cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao trung bình khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng khoảng 0,3 g/cây và có từ 2-3 rễ/cây được lựa chọn để đưa ra vườn ươm. Đưa các cây con này ra khu thích nghi đặt trong nhà kính vườn ươm, khu nhà kính này đảm bảo các tiêu chuẩn về tránh mưa và nắng trực tiếp, có hệ thống quạt làm mát, quạt đảo gió, có hệ thống cắt nắng từ 60 đến 90% ánh sáng tự nhiên, nhiệt độ điều chỉnh chủ động khoảng từ 20 đến 28°C, độ ẩm không khí khoảng 80%. Thời gian để cây hoa đồng tiền trong bịch nuôi cấy để tại khu thích nghi từ 7-10 ngày. Tiếp đó, dùng kẹp, tay nhẹ nhàng lấy cây ra khỏi bịch, tránh hư hại, dập lá và tổn thương rễ. Rửa sạch môi trường bám trên rễ cây con trong dung dịch có chứa hoạt chất metalaxyl. Tiến hành ra cây trên vỉ xốp hoặc vỉ nhựa dạng lỗ, có chứa giá thể xơ dừa được giữ ẩm từ 60 đến 70%, che tối 90% trong thời gian 5-7 ngày, mỗi ngày kiểm tra và phun sương khoảng 2-5 lần/ngày, sau 10 ngày bắt đầu tưới phân và chăm sóc bình thường. Thời gian ươm cây tại vườn ươm khoảng 1,5-2 tháng thì có thể xuất bán cây cho các nhà vườn trồng hoa.

Qua nhiều thử nghiệm ở các thời điểm khác nhau trong năm, trên nhiều giống của hoa đồng tiền nuôi cấy tại vườn ươm Công ty Florist Việt Nam tại Hà Nội. Sáng chế cho thấy tỷ lệ cây sống và phát triển tốt sau 30 ngày ra ngôi đạt tỷ lệ trung bình trên 80% khi cây được chuẩn hóa theo tiêu chí: Cây Hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao trung bình khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng 0,3 g/cây và có từ 2 đến 3 rễ/cây.

### **Hiệu quả đạt được của sáng chế**

Quy trình nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào theo sáng chế đã tạo ra được số lượng cây giống lớn và sạch bệnh, đồng đều trong một thời gian ngắn, cây ổn định về mặt di truyền, giảm chi phí sản xuất, đáp ứng nhu cầu của thị trường và đã mở ra một tiềm năng phát triển lớn, chủ động được nguồn cây giống tại chỗ phục vụ được nhu cầu cao sử dụng trong nước và hướng tới xuất khẩu.

Quy trình theo sáng chế đã đưa mẫu vào nuôi cấy thành công, đặc biệt là việc bổ sung TDZ 0,05mg/L vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống, vô trùng và mẫu bật chồi đạt rất cao 80,6%. Với môi trường nhân nhanh MS có bổ sung nước dừa 10%, đường 20g/L, 6,5g/L thạch, IBA 0,05mg/L, BA 0,5mg/L, độ pH 6,0, sau 4 tuần nuôi cấy hệ số nhân giống đạt 3,5 lần. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất trong môi trường MS có bổ sung nước dừa 10%, đường 20g/L, thạch 6,5g/L, than hoạt tính 1g/L, và IBA 0,5 mg/L,  $\alpha$ NAA 0,05mg/L, độ pH 6,2.

Quy trình theo sáng chế có thể áp dụng để chuyển giao công nghệ cho các đơn vị khác hoặc trực tiếp tổ chức sản xuất.



## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống hoa đồng tiền (*Gerbera jamesonii*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo chồi mẫu ban đầu

tuyển chọn những cây hoa đồng tiền khỏe mạnh, không bị biến dị, có màu sắc hoa đẹp làm vật liệu tạo chồi, mẫu để nhân giống là đế của nụ hoa đồng tiền có chiều cao từ 0,5 – 2,0cm, lựa chọn kỹ các mẫu, loại bỏ các tế bào chết xung quanh và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 20 phút, ngâm trong nước tẩy rửa Lifeboy trong 10 phút, sau đó tiếp tục để dưới vòi nước chảy trong 4-6 giờ, tiếp theo đưa mẫu vào tủ cấy, rửa lại 5-6 lần bằng nước cất vô trùng và lắc trong dung dịch  $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$  10% trong 7-9 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, tiếp theo lắc trong dung dịch  $\text{HgCl}_2$  0,2% trong 2-3 phút, cuối cùng rửa lại 6 lần bằng nước cất vô trùng, các mẫu cấy sau khi khử trùng xong, để hoa được loại bỏ sạch lớp áo bên ngoài, mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung TDZ 0,05mg/L, nước dừa 10%, đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0 trong 12 tuần, quang chu kỳ 12 giờ/ngày cường độ ánh sáng 1500 lux, nhiệt độ đạt  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  để thu được chồi cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô;

b) nhân nhanh chồi và cụm chồi

chuyển các mẫu sau khi bật chồi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA (Benzyladenin) 0,5mg/L, IBA (axit Indole-3-butyric) 0,05mg/L, nước dừa 10% , đường 30g/L, thạch 6,5g/L, độ pH 6,0, thời gian nuôi cấy là 4 tuần;

c) tạo và chuẩn hóa cây con hoàn chỉnh

tách nhỏ và cấy các cụm chồi sau khi thu được ở giai đoạn nhân nhanh có kích thước 2-3cm vào bình chứa môi trường MS có bổ sung IBA (axit Indole-3-butyric) 0,5mg/L,  $\alpha\text{NAA}$  (axit  $\alpha$ -Naphthalen axetic) 0,05mg/L, đường 30g/L, nước dừa 10%, than hoạt tính 1,0g/L, và thạch 6,5g/L, độ pH 6,2, các mẫu được nuôi cấy trong điều kiện môi trường với quang chu kỳ 12 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 1500 lux và nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sau 2 tuần thu được cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô có chiều cao khoảng từ 3 đến 4cm, có từ 2 chồi trở lên với từ 4-6 lá, khối lượng khoảng 0,3g/cây và có 2-3 rễ; và

d) ra ngôi cây con ngoài vườn ươm

để cây thu được ở bước c) ra ngoài vườn ươm 5-7 ngày, sau đó tiến hành ra cây, rửa sạch môi trường bám ở cây hoa đồng tiền sau đó khử trùng cây trong dung dịch có chứa hoạt chất metalaxyl nồng độ 10% trong 3 phút và trồng cây trên vỉ xốp hoặc vỉ nhựa có chứa giá thể xơ dừa, đặt cây trên giàn cao để trong vườn ươm nhiệt độ từ  $20^\circ\text{C}$  đến  $28^\circ\text{C}$ , độ ẩm không khí đạt 80% trở lên, che phủ ánh sáng tự nhiên từ 80 đến 95%, thời gian trồng khoảng 8 tuần để thu được cây hoa đồng tiền giống.



Hình 1

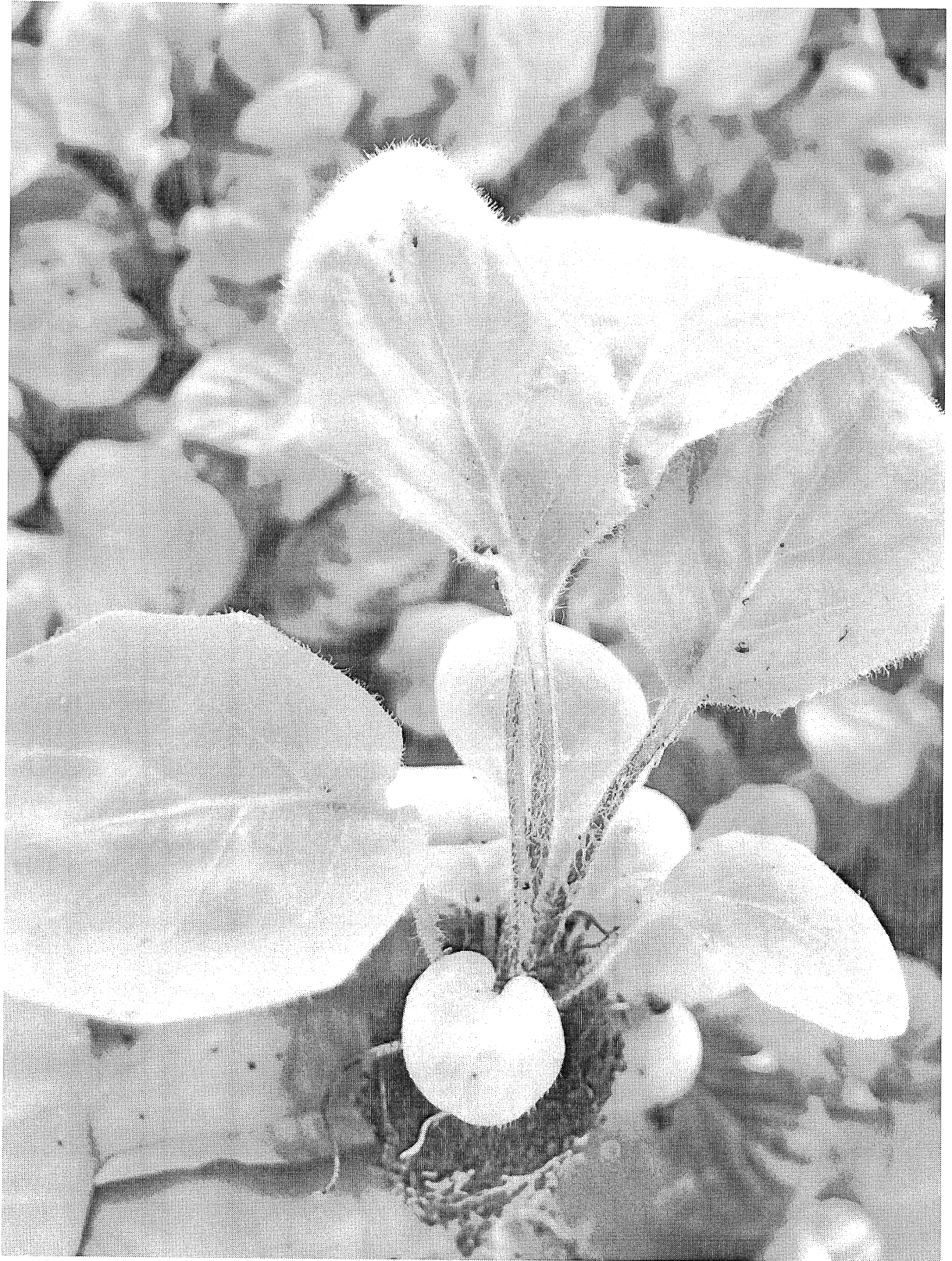


Hình 2





Hình 3



Hình 4